

EXTRACTION OF 3-HYDROXYALKANOIC ACID

Publication number: JP2001057895
Publication date: 2001-03-06
Inventor: ODAWARA OSAMU; MIYAMOTO KENJI; YOKOMIZO SATOSHI; MATSUMOTO KEIJI
Applicant: KANEGAFUCHI CHEMICAL IND
Classification:
- **international:** C12P7/62; C12P7/62; (IPC1-7): C12P7/62
- **europaen:**
Application number: JP19990233656 19990820
Priority number(s): JP19990233656 19990820

Report a data error here

Abstract of JP2001057895

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently extract and separate the subject compound by adding a divalent or polyvalent metal salt and a surfactant to a suspension of a microbial cell of a poly-3-hydroxyalkanoic acid-containing microorganism in an extraction solvent and flocculating and removing an undissolved cell residue. **SOLUTION:** A divalent or polyvalent metal salt (e.g. calcium chloride, etc.), and/or a surfactant (e.g. benzyltrimethylammonium chloride, etc.), is added to a suspension of a microbial cell of poly-3-hydroxyalkanoic acid (PHA)-containing microorganism [e.g. *Alcaligenes eutrophus* A32C(FERM P-15786) strain into which a PHA synthase gene derived from *Aeromonas caviae* is transferred, etc.], and an extraction solvent (e.g. chloroform, etc.), and undissolved cell residue is flocculated and removed from the PHA-containing solution to readily obtain a high-purity poly-3-hydroxyalkanoic acid useful as a biodegradable plastic, etc., in an improved efficiency of industrial production at a low cost.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2001-57895

(P2001-57895A)

(43) 公開日 平成13年3月6日 (2001.3.6)

(51) Int.Cl.⁷

識別記号

F I

テフー・ト (参考)

C 1 2 P 7/62

C 1 2 P 7/62

4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平11-233656	(71) 出願人	000000941 鐵道化学工業株式会社 大阪府大阪市北区中之島3丁目2番4号
(22) 出願日	平成11年8月20日 (1999.8.20)	(72) 発明者	小田原 修 兵庫県高砂市西畑1丁目13番1-303
		(72) 発明者	宮本 憲二 兵庫県明石市別所町12-32メゾン別所201
		(72) 発明者	横溝 聡 兵庫県神戸市垂水区塩屋町6-31-17三青荘
		(72) 発明者	松本 圭司 兵庫県西宮市大森町11-33
		Fターム (参考)	4B064 AD83 CA02 CA19 CC03 CC24 C002 CE08 CE20 DA16

(54) 【発明の名称】 ポリ-3-ヒドロキシアルカン酸の抽出方法

(57) 【要約】

【課題】 PHAを含有する微生物菌体からの、PHAの抽出分離を行うための抽出方法を提供すること。

【解決手段】 PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒との懸濁液に、金属塩およびまたは界面活性剤を添加して、未溶解細胞残渣を凝集させて除去することによって、効率よくPHA溶液を分離することを特徴とするPHAの抽出方法。

【0011】別の好ましい実施態様としては、PHAを含有する微生物が、アエロモナス・キャピエ由来のPHA合成酵素群遺伝子が導入された菌株である上記抽出分離方法に関する。

【0012】更に別の好ましい実施態様としては、PHAが、3HBと3HHとの2成分共重合体、または、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体である上記抽出分離方法に関する。

【0013】

【発明の実施の形態】本発明に用いる微生物は、細胞内にPHAを蓄積している微生物であれば特に限定されない。例えば、アルカリゲネス・リポリチカ (*Alicigenes lipolytica*)、アルカリゲネス・ユウトロファス (*Alicigenes eutrophus*)、アルカリゲネス・ラタス (*Alicigenes latus*) 等のアルカリゲネス属 (*Alicigenes*)、シュドモナス属 (*Pseudomonas*)、バチルス属 (*Bacillus*)、アゾバクテリウム属 (*Azotobacter*)、ノカルディア属 (*Nocardia*)、アエロモナス属 (*Aeromonas*) の菌が挙げられ、中でも、アエロモナス・キャピエ (*Aeromonas caviae*) 等の菌株、または、アエロモナス・キャピエ由来のPHA合成酵素群の遺伝子が導入された菌株、例えば、アルカリゲネス・ユウトロファス A32C (寄託番号FERM P-15786) 等がより好ましい。

【0014】これらの微生物の培養方法は、PHAを多量に効率よく菌体内に蓄積できるものであれば特に限定はなく、例えば、前記アルカリゲネス・ユウトロファス A32C (FERM P-15786) を用いる場合には、*J. Bacteriol.*, 179, 4821-4880頁 (1997) 等に記載の方法が好ましい。

【0015】本発明におけるポリ-3-ヒドロキシアルカン酸 (PHA) とは、特に限定されないが、D-3-ヒドロキシブチレート (3HB) のホモポリマーや3HBと他の3-ヒドロキシアルカン酸との共重合体が好ましく、更には、3HBとD-3-ヒドロキシヘキサノエート (3HH) との2成分共重合体 (*Macromolecules*, 28, 4822-4828 (1995)) または、3HBとD-3-ヒドロキシバレレート (3HV) と3HHとの3成分共重合体 (特開平08-28979号) などが、物性の面からより好ましい。ここで、3HBと3HHの2成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、3HBユニットの含有量が1~99モル%といった組成比のものが好適である。また、3HBと3HVと3HHとの3成分共重合体を構成する各モノマーユニットの組成比については特に限定されるものではないが、例えば、3HBユニット含有量が1~95モル%、3HVユニット含有量が1~96モル%、3HHユ

ニット含有量が1~30モル%といった組成比のものが好適である。またこれらPHAの分子量は10万以上が好ましく、50万以上がより好ましい。

【0016】PHAの微生物菌体中の含有率は、高い方が好ましいのは当然であり、工業レベルでの適用においては乾燥菌体中に20重量%以上が好ましく、抽出操作、分離操作、分離ポリマーの純度等を考慮すると50重量%以上が特に好ましい。本発明においては、前記のようにして培養して得られた微生物菌体を、培養液から分離した湿菌体としてそのまま用いても良いし、または湿菌体を凍結乾燥機等で乾燥処理して乾燥菌体として用いても良い。さらには、ミルや高圧ホモジナイザー等の物理的破砕処理、界面活性剤、次亜塩素酸ナトリウムや有機溶剤等の化学処理で菌体の一部を破壊し、または菌体の一部を除去してPHAの含有量を高めたものを用いても良い。

【0017】本発明で使用するPHAの抽出溶媒としては、PHAが溶解するものであれば特に限定されず、例えば、クロロホルム、塩化メチレン、1, 2-ジクロロエタン、ピリジン、1, 2-プロピレンカーボネートのような極式カーボネート類、テトラヒドロフラン、乳酸エチルやアセトニトリル等やこれらの溶媒の混合物、例えばクロロホルムとメタノールの混合物やクロロホルムとテトラヒドロフランの混合物等の混合溶媒系が挙げられる。

【0018】本発明で使用する金属塩としては、2価以上の金属イオンと、一般的に対イオンからなる金属塩であれば特に限定されず、例えば、金属イオンとしては、カルシウム、マグネシウム、鉄、亜鉛、アルミニウム、バリウム、マンガン、銅、コバルト等が挙げられ、対イオンとしては、塩化物イオン、硫酸イオン、リン酸イオン、硝酸イオン、炭酸イオン等が挙げられ、金属塩の具体的な例としては、塩化カルシウム、塩化マグネシウム、塩化第一鉄、塩化第二鉄、塩化亜鉛、塩化バリウム、塩化コバルト、塩化銅、塩化マンガン、塩化アルミニウム、硫酸マグネシウム、硫酸亜鉛、炭酸カルシウム、炭酸マグネシウム等が例示できる。また、本発明で用いられる界面活性剤としては、陰イオン性、陽イオン性、両性もしくは非イオン性でも良いが、好ましくは陽イオン性界面活性剤であり、具体的には、セチルトリメチルアンモニウムブロミド、D-フェリルジニウムクロリド、テトラデシルアンモニウムブロミド、セチルトリニウムクロリド、トリエチルヘキシルアンモニウムブロミド、4-4-トリメチレンビス(1-メチルピペリジン)、トリメチルフェニルアンモニウムブロミド、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリド、ヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミド、アセタミン86 (花王株式会社製) コータミン24P (花王株式会社製) 等が挙げられる。

【0019】本発明で使用する金属塩や界面活性剤の添

ァス(ATCC17699)株を、グルコースを炭素源として培養し(培地:グルコース 20g、 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9g、 K_2HPO_4 1.5g、 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 6g、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、微量金属元素溶液(組成: $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16.2g、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 10.3g、 $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2g、 $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.1g、 $\text{CrCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 16.2g、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.2g / 1L、 0.1N-HCl) 5ml / 1L、pH6.8、培養温度30℃、培養時間48時間)、3HBのホモポリマー(3HBユニット 100%)を菌体内に約60重量%含有した菌体を得た。これを遠心分離処理(5000rpm、10min)して培養液から分離し、湿潤体とした。この湿潤体を凍結乾燥し、乾燥菌体としたのちに、乾燥菌体で50g/lとなるようにクロロホルムに懸濁し、室温で5時間攪拌を行って3HBホモポリマーの抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを10g/lとなるように加えて更に1時間攪拌しクロロホルムに溶解しない細胞残査を凝集させ、これをろ紙(桐山製作所製、No.4)を用いて桐山ローに吸引し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなく、ろ過を行うことが出来た。得られた濾液に、攪拌しながらメタノールを加えて3HBホモポリマーの結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた3HBホモポリマーの回収率を計算したところ、95%であった。

【0030】(実施例7)実施例6において、陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドをヘキサデシルトリメチルアンモニウムブロミドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBホモポリマーの回収率は94%であった。

【0031】(実施例8)実施例6において、抽出溶媒をクロロホルムからテトラヒドロフランに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBホモポリマーの回収率は85%であった。

【0032】(実施例9)実施例6で得られた湿潤体を、乾燥することなく50g/lとなるようにテトラヒドロフランに懸濁し、加熱還流下で5時間攪拌を行って3HBホモポリマーの抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、塩化カルシウムを10g/lとなるように加えて更に1時間攪拌し未溶解細胞残査を凝集させ、これをろ紙(桐山製作所製、No.4)を用いて桐山ローに吸引し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液を、攪拌しながら室温まで冷却し、3HBホモポリマーの結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた3HBホモポリマーの回収

率は81%であった。

【0033】(実施例10)実施例9において、塩化カルシウムを陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドに変更した以外は同様の操作を行った。得られた3HBホモポリマーの回収率は83%であった。

【0034】(実施例11)実施例1において、アルカリゲネス・ユストロファス AC32(FERM P-15786)をアエロモナス・キャピエ FA440(寄託番号FERMBP-3432)に変更した以外は同様の条件で培養し、3HBと3HHとの2成分共重合体(3HBユニット:3HHユニット=10:90(モル比))を約30重量%含有した菌体を得た。これを遠心分離処理(5000rpm、10min)して培養液から分離し、湿潤体とした。この湿潤体を凍結乾燥し、乾燥菌体としたのちに、乾燥菌体で50g/lとなるようにクロロホルムに懸濁し、室温で5時間攪拌を行って3HBと3HHとの2成分共重合体の抽出を行った。この微生物菌体を含む抽出液に、陽イオン界面活性剤であるベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを10g/lとなるように加えて更に1時間攪拌し未溶解細胞残査を凝集させ、これをろ紙(桐山製作所製、No.4)を用いて桐山ローに吸引し、凝集菌体残査を分離除去した。この時目詰まりすることなくろ過を行うことが出来た。得られた濾液に、攪拌しながらメタノールを加えて3HBと3HHとの2成分共重合体の結晶を析出させ、該結晶をろ過により集め減圧下に乾燥した。得られた3HBと3HHとの2成分共重合体の回収率を計算したところ、96%であった。

【0035】(比較例1)実施例1において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを添加しなかった以外は同様の操作を行った。ろ過の段階で目詰まりが激しく菌体残査を分離することができなかった。

【0036】(比較例2)実施例6において、ベンジルトリメチルアンモニウムクロリドを添加しなかった以外は同様の操作を行った。その結果、ろ過の段階で目詰まりが激しく菌体残査を分離することができなかった。

【0037】

【発明の効果】本発明によれば、PHAを含有する微生物菌体と抽出溶媒との懸濁液に、2価以上の金属塩や界面活性剤を添加するといった極めて簡単な操作によって、未溶解細胞残査を凝集させて除去することが可能となり、容易に高純度のPHAが得られるため、本発明は、微生物によるPHAの工業的生産の効率向上およびコストの低減に大きく寄与するものである。

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2001-057895

(43)Date of publication of application : 06.03.2001

(51)Int.Cl.

C12P 7/62

(21)Application number : 11-233656

(71)Applicant : KANEGAFUCHI CHEM IND CO LTD

(22)Date of filing : 20.08.1999

(72)Inventor : ODAWARA OSAMU
MIYAMOTO KENJI
YOKOMIZO SATOSHI
MATSUMOTO KEIJI

(54) EXTRACTION OF 3-HYDROXYALKANOIC ACID

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To efficiently extract and separate the subject compound by adding a divalent or polyvalent metal salt and a surfactant to a suspension of a microbial cell of a poly-3-hydroxyalkanoic acid-containing microorganism in an extraction solvent and flocculating and removing an undissolved cell residue.

SOLUTION: A divalent or polyvalent metal salt (e.g. calcium chloride, etc.), and/or a surfactant (e.g. benzyltrimethylammonium chloride, etc.), is added to a suspension of a microbial cell of poly-3-hydroxyalkanoic acid (PHA)-containing microorganism [e.g. *Alicyclobacillus eutrophus* A32C (FERM P-15786) strain into which a PHA synthase gene derived from *Aeromonas caviae* is transferred, etc.], and an extraction solvent (e.g. chloroform, etc.), and undissolved cell residue is flocculated and removed from the PHA-containing solution to readily obtain a high-purity poly-3-hydroxyalkanoic acid useful as a biodegradable plastic, etc., in an improved efficiency of industrial production at a low cost.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

06.08.2004

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

* NOTICES *

JPO and NCIP are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1.This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.

2.*** shows the word which can not be translated.

3.In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The extraction separation approach of the Polly 3-hydroxy alkane acid characterized by adding the metal salt and/or surfactant more than divalent, making non-dissolved cell residue condense to the suspension of the microorganism biomass containing a Polly 3-hydroxy alkane acid, and an extracting solvent, and removing from the solution containing a Polly 3-hydroxy alkane acid to it.

[Claim 2] The extraction separation approach of a Polly 3-hydroxy alkane acid according to claim 1 that a surfactant is cation nature.

[Claim 3] The extraction separation approach according to claim 1 or 2 that the microorganism containing a Polly 3-hydroxy alkane acid is the strain into which the Polly 3-hydroxy alkane acid synthetic enzyme group gene of the Aeromonas KYABIE origin was introduced.

[Claim 4] The extraction separation approach according to claim 1 to 3 that a Polly 3-hydroxy alkane acid is 3 component copolymer of 2 component copolymer of D-3-hydroxy butyrate (3HB) and D-3-hydroxy hexanoate (3HH) or D-3-hydroxy butyrate (3HB) and D-3-hydroxyvalerate (3HV), and D-3-hydroxy hexanoate (3HH).

[Translation done.]

[0026] (Example 5) In the example 4, same situation was performed except having changed the calcium chloride into benzyl trimethylammonium chloride. The recovery of 2 component copolymer of the obtained 3HB and 3HBd) was 83%.

[0026] (Example 6) The *Alcaligenes eutrophus* (ATCC17939) stock A glucose is cultivated as a carbon source (culture medium: glucose 50g and 4.139-029 g Na₂HPO₄, K₂HPO₄ 1.5g, 20ml) 15.5g and 2.2H₂O 0.2g. Minute amount metallic element solution (composition: FeCl₂·2H₂O 0.5g, CuSO₄·5H₂O 0.2g, Na₂CO₃·10H₂O 0.5g, Na₂EDTA 0.1g, CoCl₂·6H₂O 0.1g, CuSO₄ and 3H₂O 0.5g / 1L, 0.1 M HCl 0.5M / 1L). The biomass which contained the 3HB homopolymer (3HB unit: 1000) about 60% of the weight in the biomass was obtained for pH6.8, the culture temperature of 30 degrees C, and culture time amount 48 hours. Centrifugal separation processing (5000rpm, 10min) of this was carried out, and it dissociated from culture medium and considered as the wet fungus body. After freeze-drying this wet fungus body and considering as a dried cell, it suspended with chloroform so that it might become 50 g/L by the dried cell, and stirring was performed at the room temperature for 5 hours, and 3HB homopolymer was extracted, the cell residue which, in addition, stir the benzyl trimethylammonium chloride which is a cationic surfactant to the extract containing this microorganism biomass for further 1 hour so that it may become 10 g/L and it is not dissolved in chloroform at it is condensed — making — this — a filter paper (made in the Kyriyama factory, No.4) — using — Kyriyama — attraction filtration was carried out with the funnel and separation clearance of the condensation biomass medium was carried out. It was able to filter without carrying out blinding at this time. Stirring in the obtained filtrate, the methanol was added, the crystal of 3HB homopolymer was deposited, the crystal was brought together by filtration in it, and it dried under reduced pressure to it. It was 53% when the recovery of obtained 3HB homopolymer was calculated.

[0026] (Example 7) In the example 6, same situation was performed except having changed into headless trimethylammonium bromide the benzyl trimethylammonium chloride which is a cationic surfactant. The recovery of obtained 3HB homopolymer was 94%.

[0027] (Example 8) In the example 6, same situation was performed except having changed the extracting solvent into the tetrahydrofuran from chloroform. The recovery of obtained 3HB homopolymer was 93%.

[0027] (Example 9) Without drying the wet fungus body obtained in the example 6, it suspended in the tetrahydrofuran so that it might become 50 g/L, and stirring was performed under heating reflux for 5 hours, and 3HB homopolymer was extracted to the extract containing this microorganism biomass, in addition, a calcium chloride is stirred for further 1 hour so that it may become 10 g/L, and non-dissolved cell residue is condensed to it — making — this — a filter paper (made in the Kyriyama factory, No.4) — using — Kyriyama — attraction filtration was carried out with the funnel and separation clearance of the condensation biomass residue was carried out. It was able to filter without carrying out blinding at this time. The obtained filtrate was cooled to the room temperature, stirring, the crystal of 3HB homopolymer was deposited, these crystals were collected by filtration, and it dried under reduced pressure. The recovery of obtained 3HB homopolymer was 91%.

[0027] (Example 10) In the example 9, same situation was performed except having changed the calcium chloride into the benzyl trimethylammonium chloride which is a cationic surfactant. The recovery of obtained 3HB homopolymer was 83%.

[0028] (Example 11) It was in the example 1 and is *Alcaligenes eutrophus*. It is *Aeromonas* K1AB2 (about AC22 (FERM-1376)). Extract having changed into F1AB2 (deposition number FERM-3432), it cultivated on the same conditions and the biomass which contained 2 component copolymer (3HB unit: 3HB unit = 1030 (mole ratio)) of 3HB and 3HBd) about 30% of the weight was obtained. Centrifugal separation processing (5000rpm, 10min) of this was carried out, and it dissociated from culture medium and considered as the wet fungus body. After freeze-drying this wet fungus body and considering as a dried cell, it suspended with chloroform so that it might become 1 and 50g / by the dried cell, and stirring was performed at the room temperature for 5 hours, and 2 component copolymer of 3HB and 3HBd) was extracted to the extract containing this microorganism biomass, in addition, the benzyl trimethylammonium chloride which is a cationic surfactant is stirred for further 1 hour so that it may become 10 g/L,

and non-dissolved cell residue is condensed to it — making — this — a filter paper (made in the Kyriyama factory, No.4) — using — Kyriyama — attraction filtration was carried out with the funnel and separation clearance of the condensation biomass residue was carried out. It was able to filter without carrying out blinding at this time. Stirring in the obtained filtrate, the methanol was added, the crystal of 2 component copolymer of 3HB and 3HBd) was deposited, the crystal was brought together by filtration in it, and it dried under reduced pressure to it. It was 90% when the recovery of 2 component copolymer of the obtained 3HB and 3HBd) was calculated. [0028] (Example 1 of a comparison) In the example 1, same situation was performed except having not added benzyl trimethylammonium chloride. Blinding was not able to separate biomass residue violently in the phase of filtration.

[0028] (Example 2 of a comparison) In the example 5, same situation was performed except having not added benzyl trimethylammonium chloride. Consequently, blinding was not able to separate biomass residue violently in the phase of filtration.

[0028]

(Effect of the invention) Since according to this invention it becomes possible to make non-dissolved cell residue condense and to remove and PHA of a high grade is easily obtained by very simple extraction of adding the metal salt and surfactant more than dual to the suspension of the microorganism biomass and extracting solvent containing PHA, this invention contributes to the improvement in effectiveness of industrial production of PHA by the microorganism, and reduction of cost greatly.

[Translation done.]